ZUR KENNTNIS

DER

GÜRBER'SCHEN

SERUMALBUMIN-KRYSTALLE.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDICINISCHEN FACULTAT ZU BASEL

VORGELEGT VON

ANDREAS MICHEL,

APPR. ZAHNARZT IN WÜRZBURG.

GENEHMIGT AUF ANTRAG DES HERRN PROF. DR. BUNGE.

WÜRZBURG.

DRUCK DER STAHEL'SCHEN K. HOF-BUCHDRUCKEREI.

1895.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543921_0012

Das Problem, Eiweiss zu krystallisieren, hat von jeher in hohem Grade die physiologischen Chemiker beschäftigt. Liegt doch für viele Substanzen und so auch für das Eiweiss in der Krystallisation die einzige Möglichkeit sicherer Reindarstellung. Da aber alle Bemühungen in dieser Richtung lange Zeit durchaus fruchtlos blieben, behalf man sich endlich mit der Annahme, die Eiweisskörper seien überhaupt nicht krystallisierbar. Ja, man ging sogar soweit, die Nicht-Krystallisierbarkeit als eine besondere Eigenschaft der Eiweisskörper hinzustellen und diese mit der Eigenschaft der genuinen Eiweisskörper durch poröse Membranen nicht hindurchzudiffundieren, in Verbindung zu setzen, was wohl am klarsten seinen Ausdruck in dem *Graham*'schen [1]) Gesetz von den Krystalloid- und Kolloidsubstanzen gefunden hat. Dieses Gesetz, wonach Diffusibilität und Krystallisierbarkeit von einander ebenso abhängig gedacht werden, wie Nicht-Diffusibilität und Nicht-Krystallisierbarkeit hat die Aufnahme in die meisten Lehrbücher der Physiologie und Physik gefunden, trotzdem die Thatsache, dass das gewiss exquisit kolloidale d. h. nicht diffusible Hämoglobin überaus leicht zu krystallisieren ist, entschieden gegen die Richtigkeit desselben spricht. Dasselbe gilt auch für die Kieselsäure, das Thonerdehydrat, Eisenoxyd und Kupferoxydammoniaklösung, die alle nicht durch poröse Scheidewände hindurchdiffundieren und dennoch als Bergkrystall, Rubin, Eisenglanz und Azurin krystallisiert vorkommen. Dieses Vorurteil, dass Nicht-Diffusibilität und Nicht-Krystallisierbarkeit miteinander identisch seien, hat sich so sehr als feste Anschauung in physiologischen Kreisen eingebürgert, dass, als die ersten Angaben über die Möglichkeit Eiweiss zu krystallisieren in der

1) *Ph. Graham*: Philosophical Transactions. Vol. 151. Part. I.

Literatur auftauchten, diese nur wenig Beachtung und noch weniger Glauben fanden.

Die ersten Angaben über krystallinische Eiweisskörper verdanken wir den Botanikern, die in Knollen und Samen gewisser Pflanzen mikroskopisch kleine Krystallgebilde entdeckten und diese später als Eiweiss erkannten. Aleuronkrystalle — so nannten die Botaniker diese krystallinischen Eiweisskörper — fand man in der Rindenschicht der Kartoffel, in den Zellkernen von Lathraea squamaria, dann in verschiedenen Samen, so in der Paranuss, Kürbis-, Hanf- und Ricinussamen.

Maschke[1]), *Ritthausen*[2]), *Schmiedeberg*[3]), *Drechsel*[4]), *Grübler*[5]) gelang es nicht nur solche Protëinkörner, namentlich der Paranuss und Kürbissamen, durch Aufschlemmen und Dekantieren des zerkleinerten Materials in grösserer Menge zu isolieren, sondern auch eine Auflösung derselben in 10—20 % Kochsalzlösung als solche oder als Magnesiumverbindung wieder zur Krystallisation zu bringen. Diese Eiweisskrystalle gehören ihrem chemischen Verhalten nach zu den globulinen Eiweisskörpern. Von tierischen Eiweisskörpern war bis vor kurzem nur das Hämoglobin als krystallisierbar bekannt. Da gelang es vor einigen Jahren *Hofmeister*[6]) durch ein einfaches aber äusserst sinnreiches Verfahren auch einen Eiweisskörper vom Charakter der Albumine zu krystallisieren und dadurch für die Eiweisschemie ungeahnte Fortschritte anzubahnen. *Hofmeister* versetzt zu diesem Zwecke zu Schaum geschlagenes, verflüssigtes Hühnereiweiss mit demselben Volumen einer konzentrierten Ammoniumsulfatlösung, wodurch Globulin gefällt wird. Setzt er nun das Filtrat der allmähligen Abdunstung aus oder dialysiert er das Filtrat gegen eine abdunstende Ammoniumsulfatlösung, so entstehen im ersteren Falle vorerst sphaeroide Krystallgebilde, die bei weiterer Krystallisation zu schön krystallinischen Prismen oder Nadeln werden; im zweiten Falle krystallisierte das Albumin sogleich in wohlausgebildeten Krystallformen aus.

---

1) *O. Maschke*, Botan. Zeitung, 1859.
2) Jahrb. ü. d. Fortsch. d. Tierchemie, 1878, p. 16.
3) *Schmiedeberg*: Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. I. S 205.
4) *E. Drechsel*: Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 19. S. 331.
5) *Grübler*: Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 23, S. 97.
6) *Fr. Hofmeister*: Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XIV. u. XVI.

Diese Methode *Hofmeisters* und seine sich hieran anschliessenden Theorien sind manchfachen Zweifeln begegnet und eine oft nicht gerade immer sachgemässe Kritik hat es sogar so weit gebracht, dass diese entschieden grossartigste Entdeckung der neueren Zeit auf dem Gebiete der Eiweisschemie lang nicht die wissenschaftliche Verwertung fand, die ihr zweifellos zukommt. Endlich aber scheint sich diese Entdeckung doch Bahn zu brechen und nicht zum mindesten ist dieser Erfolg den Untersuchungen *Gabriel*'s[1]) zu verdanken, der die *Hofmeister*'sche Methode etwas vereinfachend neue Beweise dafür erbrachte, dass die *Hofmeister*'schen Albuminkrystalle wirklich reines Eiweiss darstellen. Dass man sich über die Bedeutung der *Hofmeister*'schen Methode nicht täuschte, zeigten sodann die Untersuchungen von *Bondzynski*[2]) und *Zoja*[3]) aus *Bunge*'s Laboratorium. Diesen gelang es sogar mehrere krystallinische Albumine aus dem Hühnereiweiss darzustellen und so zu zeigen, wie ein bis jetzt als einheitlich aufgefasster Eiweisskörper aus mehreren, in ihren Eigenschaften nicht unwesentlich verschiedenen Eiweisskörpern bestehen kann.

Den grössten Erfolg von physiologischem Interesse hat aber bis jetzt die *Hofmeister*'sche Methode in *Gürber*'s[4]) Krystallisation des Serumalbumins erreicht. Wenn auch die Methode *Gürber*'s in manchen Punkten von der *Hofmeister*'schen beträchtlich verschieden ist, in der Grundlage, nämlich in der Anwendung von Ammoniumsulfat zur Erzeugung der Krystalle stimmt sie ja doch mit dieser überein. Der Versuch Serumalbumin zu krystallisieren ist auch, aber erfolglos, von *Bondzynski*[4]) und *Zoja*[4]) gemacht worden.

Die Resultate von *Gürber*'s Versuchen sind nicht nur deshalb wichtig, weil sie die Möglichkeit darthun Eiweisskörper von so eminentem, physiologischem Interesse wie Serumalbumin durch Krystallisation rein darzustellen, sondern auch durch die Thatsache, dass das bis jetzt fast allgemein als einheitlich aufgefasste Serumalbumin aus mehreren, vielleicht sogar sehr vielen Eiweisskörpern zusammengesetzt ist, die durch ein verschiedenes Krystallisationsvermögen leicht von einander getrennt und unter-

---

1) *Gabriel*: Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV.
2) *Bondzynski* u. *Zoja*: Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XIX.
3) *Gürber*: Sitzungsber. d. Würzburger phys.-med. Gesellsch. 1894 u. 1895.
4) l. c.

schieden werden können. Zwar hat schon *Halliburton*[1]) die Behauptung aufgestellt aus Blutserum durch fraktionierte Hitze-Coagulation drei verschiedene Albumine dargestellt zu haben. Doch man wird zugeben, dass die Trennung der Eiweisskörper durch fraktionierte Gerinnung auf keinen Fall mit einer Methode konkurrieren kann, die es ermöglicht die verschiedenen Albumine durch fraktionierte Krystallisation von einander zu trennen. Aus *Gürber*'s vorläufigen Mitteilungen geht hervor, dass das Pferdeserum wenigstens drei verschiedene krystallisierbare Albumine enthalte und daneben noch nicht krystallisierbares Eiweiss.

Die Krystallisationsbedingungen, sowie die elementare Zusammensetzung und Eigenschaften des ersten dieser krystallisierenden Albumine genauer festzustellen und zu untersuchen, ist die Aufgabe, die mir Herr Dr. *Gürber* als Thema für die vorliegende Untersuchung gestellt hat.

Ich will die Lösung dieser Aufgabe damit beginnen, den Vorgang der Krystallisation der Serumalbumine ausführlicher zu beschreiben, als das Herr Dr. *Gürber* in seinen vorläufigen Mitteilungen zu thun im stande war.

Darstellung der Krystalle.

Arterielles Pferdeblut wird durch mindestens 20 Minuten langes Schlagen defibriniert und sodann auf der Centrifuge das Serum von den Körperchen getrennt. Das mehr oder weniger rötlich gefärbte Serum wird mit dem gleichen Volum einer neutralen konzentrierten Lösung von Ammoniumsulfat versetzt. Dabei scheidet sich ein starker Niederschlag ab, der allgemein für Serumglobulin gehalten wird. Bevor man diesen Niederschlag abfiltriert, lässt man das Serumammoniumsulfatlösungsgemisch einige Stunden zur vollständigen Abscheidung des Globulin in zugedecktem Glasgefässe stehen und filtriert dann durch mehrere grosse Faltenfilter den Niederschlag ab. Das Filtrat enthält nun noch das Albumin und um darin einen weiteren Eiweissniederschlag durch Ammoniumsulfatlösung zu erzeugen, muss man wenigstens 20 Vol.% der Lösung zusetzen. Es gibt demnach die halbe Sättigung des Serum mit Ammoniumsulfat eine scharf charakterisierte Fällung. Lässt man das Filtrat zur allmähligen Abdunstung stehen, so trübt sich dasselbe nach einiger

[1]) *Halliburton*, Journ. of Physiol. Bd. V. S. 152.

Zeit und der Trübung folgt ein massiger Niederschlag, der jedoch nur selten Andeutungen einer krystallinischen Struktur zeigt. Wird dagegen zu dem Filtrat so viel Ammoniumsulfat sogleich nach dem Filtrieren zugesetzt, dass eine leichte bleibende Trübung resultiert, so geht die Trübung beim ruhigen Stehen schon in wenigen Minuten in einen nach einigen Stunden vollständig abgesetzten, hellgelb gefärbten Niederschlag über, der sich bei mikroskopischer Untersuchung als aus einer unendlichen Zahl kleinster Kryställchen bestehend erweist. Ist der Zusatz von Ammoniumsulfat zum Filtrat zu klein bemessen, so dass selbst innerhalb 24 Stunden noch kein Niederschlag entstanden ist, dann bleibt auch bei weiterem Stehenlassen die Krystallisation aus, und ein nachheriger Zusatz von Ammoniumsulfatlösung erzeugt wohl einen Niederschlag, aber einen nicht krystallinischen. Ebenso kann ein übermässiger Zusatz von Ammoniumsulfatlösung zum Filtrat die Krystallbildung verunmöglichen, weil dadurch das krystallisierende Albumin amorph gefällt wird und diese amorphe Fällung auch der Entstehung der sich erst bei höherem Gehalt an Ammoniumsulfat ausscheidenden Krystalle hinderlich ist.

Aus alle dem geht hervor, dass zum Gelingen der Krystallisation der richtige Zusatz von Ammoniumsulfatlösung zum Filtrat getroffen werden muss. Ein Maass für den Zusatz von Ammoniumsulfatlösung ist, wie Herr Dr. *Gürber* schon hervorgehoben hat, aus dem Grunde nicht möglich, weil die Zusammensetzung des Serum selbst von einer und derselben Tierart sehr variabel ist, und von der Zusammensetzung des Serum ist das Gelingen der Krystallisation in hohem Grade abhängig. Als ziemlich sichere Angabe für die Grösse des Zusatzes kann jedoch gelten, dass man dem Filtrat gleich $^1/_5$ Volumen konzentrierte Ammoniumsulfatlösung zusetzen muss. Es tritt dann meist vorerst eine leichte opalescierende Trübung auf, die nach kurzer Zeit in den krystallinischen Niederschlag übergeht. Sollte nach Zusatz der angegebenen Menge der Ammoniumsulfat-Lösung die opalescierende Trübung nicht zum Vorschein kommen, so fügt man in kleinen Portionen mehr Ammoniumsulfatlösung zu, bis der gewünschte Effekt erreicht ist. Am zweckmässigsten ist es, in einem Masscylinder eine kleine Probe des Filtrates mit Ammoniumsulfatlösung zu mischen und so den bis zum Eintritt der Trübung notwendigen Zusatz von Ammoniumsulfatlösung zu

bestimmen, um dann erst die gesammte Menge des Filtrates mit der nunmehr zu berechnenden Menge Ammoniumsulfatlösung zu versetzen.

Im Verlaufe von 24 Stunden ist die Krystallisation vollständig geworden und hat sich der Niederschlag abgesetzt. Man hebert nun die darüber stehende klare Flüssigkeit, so weit möglich, ab, den Niederschlag selber bringt man auf ein grosses Filter und lässt ihn zugedeckt abtropfen. Um in dem Filtrat einen weiteren Eiweissniederschlag zu erzeugen, muss man auf 100 ccm desselben 15—20 ccm konzentrierte Ammoniumsulfatlösung zusetzen. Es tritt dann auch nach diesem Zusatz zuerst wieder eine leichte Trübung auf, die im Verlaufe einiger Stunden beim Stehen in zugedecktem Glase zu einem massigen Niederschlage wird, der neben viel amorphem Eiweiss ebenfalls Krystalle enthält, die sich aber in Krystallform und Grösse wesentlich von den ersten Krystallen unterscheiden. Nach 24 Stunden hat sich auch dieser Niederschlag vollständig gesenkt; die darüber stehende Flüssigkeit wird wiederum abgehebert, der Niederschlag selber auf Filter gebracht. Im Filtrat erzeugt nun schon ein Zusatz von 10 ccm Ammoniumsulfatlösung auf 100 ccm Filtrat die besprochene Opalescenz, der wiederum nach 24 Stunden ein wohlabgesetzter Niederschlag folgt. Dieser Niederschlag, an Masse bedeutend geringer als der der ersten und zweiten Fällung, besteht ebenfalls z. T. aus amorphem Eiweiss, zum grösseren Teil aber aus langen nadelförmigen Krystallen. Auch hier wird durch Abhebern der Niederschlag von der Mutterlauge getrennt und in letzterer durch weiteren Zusatz von 8—10 ccm konzentrierter Ammoniumsulfatlösung eine neue Trübung hervorgerufen. Diese Trübung führt nach einiger Zeit zu einem Niederschlag, der fast ganz aus sehr kleinen wetzsteinförmigen Kryställchen besteht. Die Menge dieses Niederschlages ist schon sehr gering. Dieser wird von der Mutterlauge getrennt und letzterer wiederum Ammonium-Sulfatlösung zugesetzt und zwar auf 100 ccm Mutterlauge etwa 5 ccm Lösung. Dabei entsteht ein neuer aber nun ganz amorpher Niederschlag.

Durch weiteren Zusatz von Ammoniumsulfatlösung zur Mutterlauge lassen sich noch 2—3 derartige fraktionierte Fällungen erhalten, doch muss ich hier bemerken, dass der Zusatz von Ammoniumsulfatlösung zum Erwirken eines neuen Niederschlages gewöhnlich nur gering zu sein braucht, sodass man mehr oder

weniger den Eindruck hat, es handle sich bei diesen letzten Fällungen nicht mehr um scharf charakterisierte Fraktionen.

Von diesen Fällungen will ich nur die erste, rein krystallinische hier eingehender besprechen, indem ich damit beginne, das allmählige Entstehen der Krystalle etwas ausführlicher zu beschreiben.

Ist im Filtrat vom Globulinniederschlag durch weiteren Zusatz von Ammoniumsulfatlösung die leicht opalescierende Trübung aufgetreten und entnimmt man demselben nach einer halben Stunde, wo die Trübung schon anfängt, in Niederschlag überzugehen, eine Probe zur mikroskopischen Untersuchung, so sieht man bei sehr starker Vergrösserung neben schwach lichtbrechenden kleinsten Körnchen, stark lichtbrechende längliche Gebilde, die sich bei noch stärkerer Vergrösserung entweder schon als hexagonale Kryställchen erweisen, oder Büschel feinster Nädelchen darstellen. Die Kryställchen sind auf der einen Seite abgerundet, auf der anderen Seite endigen sie in einer sechsseitigen Pyramide. Sehr häufig ist nun, dass sich 2 Kryställchen an der abgerundeten Seite mit einander verbinden und so Zwillinge bilden. Dasselbe kann man auch an den Krystallbüscheln beobachten, die an der Basis miteinander verbunden sind. Entnimmt man im Verlauf einer weiteren halben Stunde eine zweite Probe zur Untersuchung, so haben die Kryställchen schon an Zahl und Grösse bedeutend zugenommen, was nun so fort geht bis zur 4. oder 5. Stunde. Nach dieser Zeit findet man nun eine sehr auffallende Veränderung an den Krystallbüscheln. Diese werden nämlich immer schlanker, gleichen bei schwächerer Vergrösserung schon vollkommen den homogenen Krystallen, während bei stärkerer Vergrösserung noch die einzelnen Krystallnadeln in ihnen zu unterscheiden sind. Allmählig aber verschmelzen diese Krystallnadeln zu dem homogenen 6seitigen Prisma mit aufgesetzter Pyramide, eben der charakteristischen Krystallform für das hier krystallisierende Serumalbumin.

Nach 24 Stunden, wenn die Abscheidung der Krystalle ihr Ende erreicht hat, sind die Krystallbüschel fast vollständig aus dem Krystallbrei verschwunden, bezw. in homogene Krystalle übergegangen. Dagegen finden sich jetzt häufig Rosetten und Durchwachsungen von wohlausgebildeten hexagonalen Prismen. Der Krystallbrei ist hellgelb bis dunkelgelb gefärbt.

Dieser Krystallbrei, der, wie schon erwähnt, mehr oder weniger gelb gefärbt ist, wird in destilliertem Wasser aufgelöst, die Lösung, wenn nötig filtriert, und dann wieder mit so viel Ammoniumsulfatlösung versetzt, bis die bekannte opalescierende Trübung eintritt. Man lässt nun bei bedecktem Glase 24 Stunden stehen. Dabei setzt sich ein wolkiger Niederschlag ab, der geringe Mengen wohlausgebildeter Krystalle enthält, selbst aber aus amorphem Eiweiss besteht. Das Eiweiss dieses Niederschlags muss als eine Verunreinigung des eigentlichen krystallisierenden Eiweisses aufgefasst werden, weshalb man es abfiltriert und nicht weiter beachtet. Setzt man nun noch eine ganz geringe Menge Ammoniumsulfat zum Filtrat und lässt wiederum bei bedecktem Glase 24 Stunden stehen, so scheidet sich innerhalb dieser Zeit fast das gesammte krystallisierende Eiweiss in Form schöner grosser Prismen aus. Der Krystallbrei ist nun schon bedeutend weniger gefärbt, der färbende Körper ist in der Mutterlauge geblieben. Daneben enthält die Mutterlauge immerhin noch krystallisierendes Eiweiss, das erst bei weiterem Zusatz von Ammoniumsulfat gefällt wird, aber sowohl in Krystallform wie in Grösse der Krystalle von dem zuerst auskrystallisierten Eiweiss sich unterscheidet, weshalb ich es für meine Zwecke nicht weiter zu untersuchen brauchte.

Durch mehrmaliges Auflösen der abgesetzten Krystalle und Wiederauskrystallisieren durch Zusatz von Ammoniumsulfat wird das Eiweiss von den letzten Spuren anhaftenden Farbstoffes und etwa amorph ausfallenden Eiweisses befreit. Man erhält zuletzt ein Präparat, das bei mikroskopischer Untersuchung aus lauter schön krystallisierten Prismen besteht.

Will man recht grosse Krystalle bekommen, so setzt man beim letzten Umkrystallisieren nicht bis zum Eintritt der Trübung Ammoniumsulfat zu, sondern etwas weniger und lässt das Glas offen stehen. Dann scheiden sich innerhalb 24 Stunden Krystalle ab, die bis über 1 mm lang sind und von denen ich eine Mikrophotographie dieser Abhandlung beigefügt habe.

Die grossen Krystalle sind nun besonders geeignet, das Krystallographische genauer zu studieren. Sie zeigen besonders schön und unzweideutig, dass die Krystalle dem hexagonalen System angehören. Merkwürdig ist dabei die Thatsache, dass auch bei diesen wohlausgebildeten Krystallen immer nur auf einer Endfläche des Prisma eine Pyramide aufgesetzt ist, während

die andere Endfläche entweder ganz eben oder sphärisch ist. Dagegen kommt es häufig vor, dass zwei Krystalle mit einander zu einem langen Krystall sich verschmelzen und dadurch als ein Krystall imponieren, der auf beiden Endflächen eine Pyramide trägt. Man kann aber an den meisten dieser Krystalle ihre Zusammensetzung aus zwei Krystallen erkennen. Im polarisierten Lichte erscheinen die Krystalle doppelbrechend und zwar als positiv doppelbrechend.

Wie leicht es nun ist, die Krystalle zu erhalten, so schwierig oder geradezu unmöglich ist es, auf einfache Weise die Krystalle von der Mutterlauge frei zu machen. Alle Manipulationen, die die Abscheidung des Ammoniumsulfats in festem Zustand bezwecken, veranlassen eine sofortige Zerstörung der Krystalle. Trägt man z. B. den Krystallbrei, wie das *Hofmeister* gethan hat mit seinen Eieralbuminkrystallen, in absoluten Alkohol ein, so wird selbstverständlich das Ammoniumsulfat der den Krystallen anhaftenden Mutterlauge gefällt und damit die Krystalle selbst sofort zerstört. Ebenso wirkt die Fällung der Schwefelsäure durch Bariumchlorid, desgleichen vollständiges Austrocknen des Krystallbreis, wobei eben das Ammoniumsulfat auskrystallisiert. Trägt man den Krystallbrei in kochendes Wasser ein, so werden die Krystalle ebenfalls momentan zerstört.

Dagegen bleiben die Krystalle vollständig erhalten, wenn man sie in ihrer Mutterlauge oder noch besser in einer neuen Lösung Ammoniumsulfat von der Konzentration der Mutterlauge aufgeschwemmt, auf dem Wasserbade erhitzt. Dadurch werden die Krystalle in Wasser unlöslich, verlieren ihr Doppelbrechungsvermögen, sind aber sonst in Aussehen und Form mit den nicht koagulierten Krystallen identisch.

Diese in Wasser unlöslichen offenbar koaguliertes Eiweiss repräsentierenden Krystalle lassen sich nun reinigen, wobei ich allerdings bemerken muss, dass es tagelangen Auswaschens mit heissem Wasser bedarf, um die letzten Spuren von Ammoniumsulfat zu entfernen. Es mag dies vielleicht dadurch bedingt sein, dass die Krystalle in hohem Grade das Bestreben zeigen, sich mit einander rasch zu klumpigen Massen zu vereinigen und so einen Teil der Mutterlauge in sich einzuschliessen, wozu noch kommt, dass sich die Krystalle beim Behandeln mit heissem Wasser in diesem sehr leicht senken und dadurch den Eintritt

des Wassers in den Krystallbrei unmöglich machen. Es wäre aber auch denkbar, dass die Krystalle bei ihrem Entstehen mechanisch etwas Ammoniumsulfat in sich einschlössen, das begreiflicherweise nur schwer aus den Krystallen entfernt werden könnte.

Nachdem die letzte Spur von Ammoniumsulfat aus dem Krystallbrei ausgewaschen ist und auch in einer durch Pepsinverdauung aufgelösten Probe von Krystallen sich keine Spur von Schwefelsäure mehr nachweisen lässt, wird die ganze Krystallmasse in absoluten Alkohol eingetragen und so unter mehrmaliger Erneuerung des Alkohol entwässert. Zum Schluss wird dann noch mit Aether nachgewaschen und bei 110° getrocknet.

Dass die so hergestellten Krystalle überhaupt Eiweiss sind, hat Herr Dr. *Gürber* auf das Zweifelloseste bewiesen, indem er zeigte, dass sie alle die Reaktionen geben, die wir mit koaguliertem Eiweiss anstellen können. Sie färben sich beim Kochen mit Salpetersäure gelb, mit *Millon*'s Reagens rot, geben in Natronlauge aufgelöst mit Kupfer die Biuretfärbung. Durch Pepsin-Salzsäure werden sie leicht verdaut, wobei alle die Spaltungsprodukte auftreten, die bis jetzt bei der Verdauung der Eiweisskörper bekannt sind.

Den wichtigsten und vollgültigsten Beweis aber, dass diese Krystalle aus absulut reinem Eiweiss bestehen, gibt natürlich die Elementaranalyse.

Elementare Zusammensetzung der Krystalle vom Serumalbumin I.

Es wurden 2 von einander absolut getrennt hergestellte Präparate analysiert und zwar von dem I. Präparat 4 Verbrennungen, 3 Stickstoffbestimmungen und 2 Schwefelbestimmungen ausgeführt; vom II. Präparat 3 Verbrennungen, 3 Stickstoffbestimmungen und 2 Schwefelbestimmungen.

Das Nähere über die Ausführung der Analysen ist bei den analytischen Belegen nachzusehen. Die Resultate, die ich dabei erhielt, sind folgende:

	C	H	N	S	O
	%	%	%	%	%
I. Präparat	53,09	7,1	15,93	1,895	21,98
II. Präparat	53,07	7,13	15,93	1,912	21,958

Nach den Analysen dieser beiden Präparate ist es ganz zweifellos, dass die Albuminkrystalle nicht nur Eiweiss, sondern sogar so reines Eiweiss sind, wie es bis jetzt noch nie hergestellt worden ist, denn bei allen Analysen über Eiweiss, bei denen verschiedene Präparate von einem reinen Eiweisskörper analysiert worden sind, wurden noch nie so übereinstimmende Resultate über die elementare Zusammensetzung erhalten, wie in diesem Falle.

Ich will zum Vergleich die bisherigen Angaben über die Zusammensetzung von Serumalbumin mit meinen Befunden in Parallele bringen:

	Gürber's Serumalbum.-Krystalle	*Dumas* und *Cahours* [1]	*Weidenbusch* [2]	*Brittener* [3]	*Hammarsten* [4]
	%	%	%	%	%
C	53,08	53,5	52,6—53,2	53,5	52,25—53,05
H	7,115	7,1	7,3— 7,0	7,1	6,65— 6,85
N	15,93	15,8	16,5—15,7	15,6	15,8 —16,04
S	1,9035	—	1,6— 1,5	1,3	2,3 — 1,8
O	21,969	—	—	—	—

[1]) *Dumas* und *Cahours*: Beilstein Handb. der org. Chemie Bd. III. S. 1266.
[2]) *Weidenbusch*: Liebigs Annal. der Chemie Bd. 61. S. 376.
[3]) *Brittener*: Beilstein Handb. der org. Chemie Bd. III. S. 1266.
[4]) *Hammarsten*: Jahresber. ü. d. Fortschritte der Tierchemie 1881. S. 19.

Es erübrigt nur noch ein Wort über den Aschengehalt der Eiweisskrystalle zu sagen. Wie Herr Dr. *Gürber* in seinen vorläufigen Mitteilungen über die Eiweisskrystalle bemerkt hat, ist der Aschengehalt derselben ein ausserordentlich kleiner, ja man würde nach der früheren Auffassung bestimmt sagen, diese wären aschefrei. Um die Menge der Asche doch zu bestimmen, wurden die Eiweisskrystalle lege artis in einer tarierten Platinschale verascht und der unverbrennliche Rückstand gewogen.

Bei der Bestimmung vom I. Präparat gaben
0,723 g Eiweiss 0,0016 g oder 0,221 % Asche,

bei der Bestimmung vom II. Präparat:
0,613 g Eiweiss 0,001 g oder 0,16 % Asche.

Wir sehen hieraus nicht nur, dass der Aschengehalt des krystallisierten Eiweisses thatsächlich ein minimaler, sondern, soweit die geringe Menge ein Urteil darüber zulässt, auch nicht konstanter ist. Bei der heutigen Auffassung von der Bedeutung der Aschenbestandteile des Eiweisses muss diese Thatsache sehr befremdend erscheinen, denn so ziemlich allgemein wird der unverbrennliche Rückstand des Eiweisses heutzutage nicht mehr als eine Verunreinigung des Eiweisses, sondern als zum Eiweissmolekül gehörig angesehen. Herr Dr. *Gürber*[1]) hat für die Richtigkeit dieser Annahme in seiner Abhandlung: „Ueber die Salze des Blutserum" den Beweis erbracht, dass im Blutserum zweifellos Aschebestandteile mit dem Eiweiss in chemischer Verbindung enthalten sein müssen. Und nun bekommen wir hier in diesem rein dargestellten Eiweiss ein Produkt, dessen Aschengehalt nicht konstant ist. Das lässt sich nur so erklären, dass durch die Reindarstellung das Albumin Veränderungen erleidet, wodurch es seinen Gehalt an anorganischen Bestandteilen z. T. einbüsst. Wir werden später sehen, wie richtig diese Auffassung ist. Was die qualitative Zusammensetzung dieser Asche betrifft, so besteht sie, so weit sie wegen der geringen Menge der Untersuchung zugänglich war, aus Kalk, Schwefelsäure und — was in hohen Grade überraschend erscheinen muss — aus Eisen. Nachdem auf Veranlassung *Bunge*'s *Socin* die Frage, ob das Blutserum Eisen enthalte oder nicht, in verneinendem Sinn beantworten konnte, ist es a priori ganz unbegreiflich, woher

[1]) Verhandl. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg. N. F. Bd. XXVIII. Hft. 7.

auf einmal das Eisen in die Eiweisskrystalle hineingelangen sollte. Nun zeigt es sich bei Untersuchung des Ammoniumsulfat, dass dieses allerdings äusserst geringe Mengen von Eisen enthält; und es ist nun wahrscheinlich, dass das krystallisierende Eiweiss das Eisen der Ammoniumsulfatlösung an sich zu ziehen im stande ist. Ob diese Auffassung zwar ganz richtig ist, will ich dahin gestellt sein lassen. Sicher dagegen ist, dass die Eiweisskrystalle immer etwas Eisen enthalten.

Durch Dialyse gereinigtes krystallisiertes Eiweiss.

Das Eiweiss, das ich im Vorstehenden in krystallisierter Form als reines Eiweiss analysiert habe, darf nun nicht etwa identificiert werden mit dem Eiweiss, aus dem es gewonnen worden ist, nämlich mit dem krystallisierenden Serumalbumin I. Es ist ganz zweifellos, dass die hier zur Reindarstellung der Krystalle nötige Koagulation Veränderungen des Eiweisses bedingen muss, die nicht nur im physikalischen Verhalten des krystallisierenden Eiweisses in Bezug auf seine Löslichkeit und auf sein optisches Verhalten, sondern auch in Bezug auf seine chemische Zusammensetzung zum Ausdruck kommen dürften. Um hierüber Aufschluss zu erhalten, habe ich einen andern Teil des durch Krystallisation gereinigten Eiweisses durch Dialyse vom Ammoniumsulfat zu befreien gesucht, was mir auch nach mehrtägigem Dialysieren gegen häufig erneuertes destilliertes Wasser vollständig gelang. Die dialysierte Eiweisslösung war absolut frei von Ammoniumsulfat. In dieser Lösung glaube ich nun das Eiweiss gerade so, wie es im Blutserum vorkommt, absolut rein enthalten zu haben, denn nach Zusatz von Ammoniumsulfat liess sich dasselbe ebenso leicht in die Form der Hexagonalkrystalle überführen, wie aus frischem Serum.

Es schien mir deshalb von Interesse, dieses reinste genuine Serumeiweiss auf seine allgemeinen Eiweisseigenschaften etwas genauer zu untersuchen, wobei mir namentlich die Bestimmung der Gerinnungstemperatur und des spezifischen Drehungsvermögens besonders von Wichtigkeit war.

Ich habe auch hier die Untersuchung an zwei ganz unabhängig von einander hergestellten Präparaten ausgeführt und

will nun in folgendem die Resultate dieser Versuche nebeneinander stellen.

Bestimmung der Gerinnungstemperatur.

Zu diesem Zweck brachte ich in ein kleines Reagenzröhrchen etwas von der Eiweisslösung und tauchte in die Flüssigkeit die Quecksilberkugel eines feinen Thermometers. Das Ganze wurde an einem Stativ befestigt, in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gebracht und dieses durch eine kleine Flamme allmählig erwärmt. Mit dem Thermometer wurde von Zeit zu Zeit die Flüssigkeit im Reagenzgläschen umgerührt. Bei 49° fing die Eiweisslösung an sich zu trüben, weshalb die Temperatur etwa für 5 Minuten auf dieser Höhe erhalten wurde, ohne dass jedoch während dieser Zeit die Trübung merklich an Stärke zunahm. Ebenso wurde bei der Temperatur von 50° verfahren, wobei die Trübung etwas stärker auftrat, jedoch eine eigentliche Koagulation noch nicht beobachtet werden konnte. Erst bei 51° ging die Trübung allmählig in eine flockige Ausscheidung über, was bei 52° sich noch deutlicher zeigte. bei 53° gestand das ganze Eiweiss zu einer gallertigen Masse. Die Gerinnungstemperatur dürfte demnach für das dialysierte Eiweiss in 3% Lösung zwischen 51°—53° gelegen sein. Bei einem zweiten Präparat in zweiprozentiger Lösung tritt das Maximum der Koagulation erst bei 54° ein.

Die Gerinnungstemperatur für das Serumalbumin wird in den Lehrbüchern angegeben zwischen 50° und 75°. Es müssen demnach in dem Serum Stoffe enthalten sein, die die Gerinnung des Eiweisses in hohem Grade verzögern und man wird wohl nicht fehl gehen, dieses Moment in dem Salzgehalt des Serum zu suchen, zumal es ja bekannt ist, dass die Salze die Gerinnungstemperatur zu erhöhen im stande sind. Setzt man der dialysierten Eiweisslösung 0,6% Kochsalz zu, dann tritt die Gerinnung in Wirklichkeit erst bei 64° ein. Ebenso hat bekanntermassen auch die Verdünnung einen beträchtlichen Einfluss auf die Höhe der Gerinnungstemperatur, was sich bei meinen Versuchen auch zeigte, indem die konzentriertere Lösung des ersten Eiweisspräparates bei etwas niedrigerer Temperatur koagulierte, als die des zweiten Präparates.

Bestimmung der spezifischen Drehung.

Die spezifische Drehung wurde mit dem *Wild*'schen Polaristrobometer ermittelt und zwar benutzte ich dabei beim I. Präparat das 1 dm Rohr, beim II. Präparat das 2 dm Rohr. Um den Drehungswinkel möglichst genau zu bestimmen, wurden 100 Ablesungen gemacht und zwar je 50, bei denen das Verschwinden der Interferenzstreifen durch Drehen des polarisierenden Nicol von rechts nach links, und 50, bei denen das Verschwinden der Interferenzstreifen von links nach rechts bewirkt worden war. In dieser Weise ist es möglich, abgesehen von der hohen Zahl der Beobachtungen, den Drehungswinkel mit höchster Wahrscheinlichkeit genau zu bestimmen. Der Eiweissgehalt der dialysierten Lösung wurde durch Eindampfen derselben in der tarierten Platinschale und Trocknen bei 110° bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Die Lösung vom Präparat I im 1 dm Rohr drehte die Polarisationsebene um 2° 24'. Die Konzentration der Lösung betrug 3,92%. Daraus berechnet sich die spezifische Drehung nach der Formel

$$a_D = \frac{100 \cdot \alpha}{p \cdot l}; \; \alpha = -2{,}4; \; p = 3{,}92; \; l = 1;$$

$$-\frac{100 \cdot 2{,}4}{3{,}92} = -61{,}2^0.$$

Die Lösung vom Präparat II zeigte einen Drehungswinkel von — 3° 56'. Die Konzentration der Lösung, berechnet aus dem beim Präparat I ermittelten spezifischen Drehungsvermögen beträgt 3,21 %, durch Eindampfen und Trocknen der dialysierten Lösung bestimmt 3,20 %.

Daraus berechnet sich das spezifische Drehungsvermögen:

$$\alpha = -3{,}933; \; p = 3{,}2; \; l = 2; \; -\frac{100 \cdot 3{,}93}{2 \cdot 3{,}2} = -61{,}0.$$

Wir sehen hieraus, dass das spezifische Drehungsvermögen dieser beiden getrennt von einander hergestellten Eiweisspräparate vollständig miteinander übereinstimmt. Das spezifische Drehungsvermögen vom Serumalbumin wird in den Lehrbüchern angegeben: $a_D = -60{,}1^0$ bis $-62{,}6^0$. Es muss demnach das, was man unter Serumalbumin bis jetzt verstanden, aus Eiweisskörpern bestehen, die ein spezifisch geringeres oder spezifisch höheres Drehungsvermögen besitzen, als das krystallisierbare Serumalbumin I.

Herr Dr. *Gürber* hat das dritte krystallisierende Serumalbumin auf seine spezifische Drehung untersucht und gefunden, dass diesem ein $a_D = -64^0$ zukommt.

Elementare Zusammensetzung des dialysierten Eiweisses.

Es wurden ebenfalls 2 Präparate analysiert. Vom Präparat I habe ich 3 Verbrennungen, 2 Stickstoffbestimmungen und 1 Schwefelbestimmung gemacht: vom Präparat II 2 Verbrennungen, 2 Stickstoffbestimmungen und 1 Schwefelbestimmung.

	C	H	N	S	O
	%	%	%	%	%
I. Präparat	53,08	7,07	15,63	1,792	22,428
II. Präparat	53,0	7,14	15,79	1,92	22,15

Da die Analysen beider Präparate mit genügender Genauigkeit übereinstimmen, so halte ich mich zu dem Schlusse berechtigt, dass auch das durch Dialyse gereinigte krystallisierbare Albumin Ein reiner Eiweisskörper sei. Die analytischen Ergebnisse verglichen mit der elementaren Zusammensetzung des in Krystallform rein dargestellten Albumin ergeben, wie auch aus nachstehender Zusammenstellung am besten ersichtlich ist, in Bezug auf Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel wohl kaum einen Unterschied.

	Rein dargestellte Albuminkrystalle	Durch Dialyse gereinigtes krystallisierendes Eiweiss
C:	53,08	53,04
H:	7,115	7,105
N:	15,93	15,71
S:	1,9035	1,856
O:	21,969	22,289

Dagegen scheint der Stickstoffgehalt beim ersten Eiweiss zweifellos etwas grösser zu sein als beim zweiten Eiweiss. Um

aber hieraus Schlüsse zu ziehen, wäre es notwendig, eine viel grössere Anzahl Elementaranalysen vom dialysierten Eiweiss zu haben, als ich sie hier zu geben im stande bin. Durch Mangel an Material bin ich leider verhindert', dieser Forderung nachzukommen und da äussere Umstände mich zwingen, diese Untersuchung zu einem Abschluss zu bringen, will ich für diesen Teil meiner Untersuchung nur die Bedeutung eines Hinweises für spätere Untersuchungen beanspruchen.

Aschengehalt.

Ganz zweifellos unterscheiden sich die beiden Eiweisskörper aber in ihrem Aschengehalt. Während die Eiweisskrystalle, wie schon hervorgehoben, einen Aschengehalt bis 0,22% ergaben, kommt dem dialysierten Eiweiss ein Aschengehalt von 0,71% beim ersten, und von 0,712% beim zweiten Präparat zu.

Was die Zusammensetzung der Asche anbetrifft, so habe ich diese nur der qualitativen Analyse unterzogen. Sie besteht aus Calcium, Schwefelsäure, einer geringen Menge Alkalimetallen und ebenfalls Eisen.

Dass die Koagulation es ist, die den Aschengehalt des Eiweisses vermindert, glaube ich durch folgenden Versuch nachgewiesen zu haben:

Das dialysierte Eiweiss, dem der obige Aschengehalt von 0,71% zukommt, wurde durch Hitze koaguliert, das Koagulum mit heissem Wasser ausgewaschen, getrocknet und der Aschengehalt bestimmt. Dieser betrug nunmehr 0,31%.

Wenn demnach die Frage, ob das als Krystall gereinigte und das krystallisierte, durch Dialyse gereinigte Serumalbumin I in Bezug auf ihre elementare Zusammensetzung mit einander identisch seien oder nicht, sich aus meinen Elementaranalysen nicht entscheiden lässt, so glaube ich mich aus dem Ergebnis der Aschenanalyse zu dem Schlusse berechtigt, dass dieselben nicht identisch seien. Ob dieser Unterschied im Aschengehalt allein etwa hinreicht, um die Verschiedenheit in den physikalischen Eigenschaften der beiden Eiweisspräparate zu erklären, will ich allerdings dahin gestellt sein lassen.

Analytische Belege.

I. C- und H-Bestimmung.

Die Verbrennung wurde im offenen Verbrennungsrohre, im Schiffchen mit Sauerstoff und Kupferoxyd vorgenommen, jedoch der Sauerstoff erst dann zugeleitet, wenn die Zersetzung der Substanz durch einfaches Glühen eine vollständige war. Zum Zurückhalten der Oxyde des Schwefels wurde eine 15 cm lange Schicht Bleichromat, für die Oxyde des Stickstoffs eine 10 cm lange, blanke Kupferspirale vorgelegt. Sauerstoff und Luft wurden chlorcalciumtrocken eingeleitet, dem entsprechend auch das Wasser durch eine Chlorcalciumröhre absorbiert. Die Kohlensäure wurde in gewohnter Weise aufgefangen.

Nachdem ich mich durch Kontrollanalysen von der Zuverlässigkeit dieser Einrichtung überzeugt und mich überhaupt für die Elementaranalyse genügend eingeübt hatte, ging ich erst zu den Analysen des Eiweisses selbst über[1]).

A. Rein dargestellte Eiweisskrystalle

bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

I. Präparat.

	Substanz gr	CO_2 gr	H_2O gr	C %	H %
1	0,1975	0,3845	0,1260	53,09	7,09
2	0,2135	0,4155	0,1367	53,08	7,11
3	0,2059	0,401	0,1320	53,11	7,12
4	0,2700	0,5255	0,1718	53,08	7,07
im Mittel				53,09	7,1

[1]) Uebrigens wurden alle Analysen unter fortwährender Aufsicht und Kontrolle des Herrn Dr. *Gürber* gemacht.

II. Präparat.

	Substanz gr	CO_2 gr	H_2O gr	C %	H %
1	0,1894	0,5397	0,1182	53,05	7,1
2	0,2700	0,5258	0,1734	53,1	7,14
3	0,1859	0,3617	0,1198	53,07	7,16
im Mittel				53,07	7,13

B. Krystallisiertes Albumin durch Dialysat gereinigt bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

I. Präparat.

	Substanz gr	CO_2 gr	H_2O gr	C %	H %
1	0,2325	0,4524	0,1487	53,06	7,1
2	0,2632	0,5124	0,167	53,09	7,05
3	0,2086	0,4030	0,1315	53,01	7,06
im Mittel				53,08	7,07

II. Präparat.

	Substanz gr	CO_2 gr	H_2O gr	C %	H %
1	0,1960	0,3807	1269,0	53,0	7,19
2	0,2159	0,4195	0,1390	53,0	7,1
im Mittel				53,0	7,14

II. N-Bestimmungen.

Diese wurde nach dem Verfahren von *Kjeldahl-Argutinsky* ausgeführt, das nach den Erfahrungen von Herrn Dr. *Gärber* ausserordentlich zuverlässige Resultate gibt. Zu dem Zweck wurde das abgewogene Eiweiss mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 1 Tropfen Quecksilber in einem kleinen Rundkolben bis zur vollständigen Entfärbung der Probe gekocht, dann unter Zusatz von Natronlauge und Kalisulfid in eine abgemessene Menge $^1/_5$ Normalschwefelsäure überdestilliert und die nicht vom Ammoniak gebundene Schwefelsäure mit $^1/_5$ Na OH zurücktitriert.

A. Rein dargestellte Eiweisskrystalle.

I. Präparat.

	Substanz gr	N gr	N %
1	0,395	0,057	15,88
2	0,28	0,0448	16,0
3	0,4854	0,0772	15,9
im Mittel			15,93

II. Präparat.

	Substanz gr	N gr	N %
1	0,2048	0,03276	16,0
2	0,2235	0,0353	15,8
3	0,2656	0,04256	16,0
im Mittel			15,93

B. Krystallisierendes Albumin durch Dialyse gereinigt.

Präparat I.

	Substanz gr	N gr	N %
1	0,264	0,04118	15,6
2	0,4305	0,06748	15,67
im Mittel			15,63

Präparat II.

	Substanz gr	N gr	N %
1	0,2712	0,0426	15,72
2	0,2783	0,0440	15,8
im Mittel			15,79

III. S-Bestimmung.

Zur Schwefelbestimmung wurde das Eiweiss mit schwefelsäurefreiem Kali und reinstem Salpeter nach den Angaben *Fresenius'* geglüht, dann die vollständig weisse Schmelze in heissem Wasser aufgenommen, die Lösung mit Salzsäure versetzt, zur Trockene verdampft, wiederum in Wasser unter Zusatz von Salzsäure gelöst und das bis zur vollständigen Entfernung der Salpetersäure wiederholt, dann wurde die Schwefelsäure aus heisser Lösung bei geringem Ueberschuss von Salzsäure mit reinstem Bariumchlorid gefällt, der Niederschlag nach dem Auswaschen durch Dekantieren auf das Filter gebracht, in gewogenem Platintiegel bei mässiger Hitze geglüht und gewogen. Da das so hergestellte Bariumsulfat häufig geringe Mengen löslicher Bariumsalze enthält, so wurde der Inhalt des Tiegels mit verdünnter heisser Salzsäure gewaschen, die Salzsäure durch ein kleines Filterchen in eine Platinschale filtriert, abgedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und mit dem ungelösten Teile durch dasselbe Filterchen filtriert, dann das Filterchen wieder in den Platintiegel gebracht und nach dem Trocknen verbrannt und das Gewicht des Bariumsulfats nochmals bestimmt. Dabei ergab sich, dass das Bariumsulfat nach dem ersten Glühen je nach seiner Menge 1—2 mg in Wasser löslicher Bestandteile enthalten hatte.

A. Reindargestellte Krystalle.

I. Präparat.

	Substanz gr	$BaSO_4$ gr	S %
1	0,3715	0,0505	1,89
2	0,689	0,0954	1,9
im Mittel			1,895

II. Präparat.

	Substanz gr	$BaSO_4$ gr	S %
1	0,5145	0,0714	1,909
2	1,530	0,213	1,915
im Mittel			1,912

B. Krystallisiertes Albumin durch Dialyse gereinigt

I. Präparat.

Substanz gr	$BaSO_4$ gr	S %
0,6235	0,0812	1,792

II. Präparat.

Substanz gr	$BaSO_4$ %	S %
0,5549	0,0776	1,92

Zum Schlusse meiner Arbeit drängt es mich, Herrn Dr. med. et phil. *Gürber*, Assistent für medicin. Chemie am physiolog. Institut der Universität Würzburg, unter dessen alleiniger Leitung die Untersuchungen angestellt wurden, für die gütige Ueberlassung eines so interessanten Themas und für die viele Mühe und liebenswürdige Unterstützung meinen wärmsten und innigsten Dank auszusprechen.

Zu Michel, Gürber'sche Serum-Albuminkrystalle.

Serum-Albumin-Krystalle I.

35fache Vergrösserung.